

Министерство образования и науки РФ

ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет
имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»

УДК 543.062

УТВЕРЖДАЮ
Проректор по науке
_____ Кружаев В.В.
«__» _____ 2013

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

В рамках выполнения п.1.2.2.3 Плана реализации мероприятий Программы развития
УрФУ на 2013 год

ПО ТЕМЕ:

Электрохимическое определение холестерина в водной эмульсии с использованием
наночастиц металлов в качестве катализаторов

(Заключительный)

Договор возмездного оказания услуг (выполнения работ, на создание произведения)
№1.2.2.3/57

Зав.кафедрой

(подпись, дата)

Матерн А.И.

Научный руководитель

(подпись, дата)

Матерн А.И.

Исполнитель

(подпись, дата)

Охохонин А.В.

Екатеринбург 2013

Реферат

1. ФИО автора (ов): Охохонин Андрей Викторович (Okhokhonin Andrei Viktorovich)
2. Аннотация: Перспективным методом определения холестерина является электрохимический метод благодаря его высокой чувствительности, простоте пробоподготовки, невысокой стоимости оборудования и его компактности. Но для применения этого метода необходимо использование электрокатализаторов, так как без них холестерин окисляется в области высоких потенциалов. Цель данной работы состояла в исследовании электрокаталитических свойств наночастиц золота и серебра, иммобилизованных на углеродсодержащих электродах, модифицированных углеродными нанотрубками, используемых в качестве электрохимических катализаторов. На основе полученных результатов был выбран электрохимический катализатор, который наилучшим образом подходит для селективного определения холестерина, и для дальнейших исследований.

Electrochemical method of determination of cholesterol is perspective through its high sensitivity, easy sample preparation, low cost of equipment and compact size. But application of this method requires using of an electrocatalysts since cholesterol oxidizes in area of high potentials without ones. The aim of present work is investigation of electrocatalytic properties of gold and silver nanoparticles immobilized on the carbon electrodes modified by carbon nanotubes, used as electrochemical catalysts. On the basis of these results the best electrochemical catalyst for selective determination of cholesterol and for further research was chosen.
3. Ключевые слова: холестерин, электрокатализ, наночастицы, вольтамперометрия, хроноамперометрия (cholesterol, electracatalysis, nanoparticles, voltammometry, chronoamperometry)
4. Тема отчета: Электрохимическое определение холестерина в водной эмульсии с использованием наночастиц металлов в качестве катализаторов (Electrochemical determination of cholesterol in a water emulsion using metal nanoparticles as catalysts).

Содержание

Оглавление

Обозначения и сокращения	4
1. Введение.....	5
2. Основная часть.....	7
2.1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	7
2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ	9
<i>Выбор каталитической системы для электрохимического окисления холестерина</i>	9
Заключение	17
Список использованных источников	18

Обозначения и сокращения

к-МСУНТ – карбоксилизированные многостенные углеродные нанотрубки

ЛСН – лаурилсульфат натрия

МСУНТ – многостенные углеродные нанотрубки

ПАВ – поверхностно-активное вещество

ТГФ – тетрагидрофуран

ТГЭ-электрод – толстополеносный графитэпоксидный электрод

УНТ – углеродные нанотрубки

ЦВА – циклическая вольтамперограмма

ЦТАБ – цетилтриметиламмоний бромид

1. Введение

Уровень холестерина в крови и тканях человека является одной из важнейших характеристик в мониторинге состояния его здоровья, так как он напрямую связан с развитием атеросклеротических нарушений в организме. Регуляция и постоянный мониторинг уровня холестерина в крови требуют развития новых экспрессных, селективных, чувствительных и дешевых методов определения его концентрации. Стандартные методы, наиболее активно использующиеся для определения холестерина, - ферментативные и колориметрические – невозможно использовать повсеместно из-за несовершенства интерпретации окраски аналитического раствора, высокой стоимости ферментов и их нестабильности, а также высокой стоимости соответствующего аналитического оборудования.

Перспективным методом определения холестерина является электрохимический метод благодаря его высокой чувствительности, простоте пробоподготовки, невысокой стоимости оборудования и его компактности. Но для применения этого метода необходимо использование электрокатализаторов, так как без них холестерин окисляется в области высоких потенциалов. Разработке и исследованию таких электрокатализаторов и посвящен данный проект.

Литературные данные показывают, что наночастицы металлов являются катализаторами электрохимического окисления ряда гидроксо- и аминосодержащих органических молекул. Электрокаталитические свойства наночастиц золота и серебра и их применение в качестве катализаторов для электрохимического определения концентрации различных соединений в настоящее время интенсивно изучаются [1,2]. Среди аналитов, которые были определены с использованием иммобилизованных на рабочем электроде наночастиц золота и/или серебра электрохимическими методами, такие соединения, как ДНК [3], этанол [4], глюкоза [5], глутатион [6], гидразин [7] и др. Также на настоящий момент опубликовано достаточно много работ по определению холестерина с использованием наночастиц золота и серебра с использованием ферментов холестериноксидазы и цитохрома P450 [8,9].

Углеродные нанотрубки (УНТ), широко применяемые в изготовлении электрохимических сенсоров, в значительной степени усиливают аналитический сигнал благодаря своим уникальным электронным, химическим и механическим свойствам [10,11]. Они подходят для модификации большого количества электродов из-за их высокой электронной проводимости в реакциях электронного переноса и высокой электрохимической и химической стабильности, как в водных, так и в органических средах.

Целью данной работы является изучение каталитических систем на основе наночастиц золота и серебра и углеродных нанотрубок, способных генерировать воспроизводимый аналитический отклик в присутствии определяемого аналита (холестерина).

2. Основная часть

2.1. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Аппаратура. Вольтамперометрические и хроноамперометрические измерения осуществляли с помощью потенциостата/гальваностата Autolab PGSTAT128N (Metrohm AG, Швейцария), управляемого программным обеспечением NOVA 1.10. Применяли трехэлектродную электрохимическую ячейку с рабочим объемом 10 см³. В качестве вспомогательного электрода использовали стеклоуглеродный стержень, электродом сравнения служил хлоридсеребряный электрод (Ag/AgCl/нас. KCl). В качестве индикаторных электродов использовали одноразовые модифицированные толсто пленочные электроды на основе эпоксидно-графитовой смеси (ТГЭ) (рисунок 1), изготовленные методом трафаретной печати. Площадь рабочей зоны составляет 10 мм².

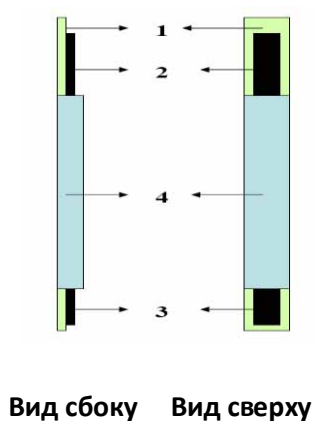


Рис. 1. Схема толсто пленочного электрода:

- 1 — полимерная подложка из стеклотекстолита;
- 2 — токопроводящий слой (углеродсодержащие чернила (ТУЭ) или графит-эпоксидная композиция (ТГЭ))
- 3 — рабочая область;
- 4 — изоляционный слой.

Взвешивания проводили на аналитических весах Scaltec SBC 33 (Scaltec Instruments GmbH, Германия) 1-го класса точности.

Реактивы. Холестерин (95%, Sigma-Aldrichб США), тетрахлорауромат золота (HAuCL₄, осч., Россия); нитрат серебра (AgNO₃,); борогидрид натрия (NaBH₄,); цитрат натрия (Na₃cit, осч., Россия); многостенные углеродные нанотрубки (МСУНТ, Sigma-Aldrich,США); гидроксид натрия (NaOH, х.ч., Россия); азотная кислота (HNO₃, конц., осч., Россия); серная кислота (H₂SO₄, конц., осч., Россия); поверхностно активные вещества: Triton X-100 (неионогенное, Sigma-Aldrich, США), , лаурилсульфат натрия (ЛСН, анионогенное, х.ч., Россия), цетилтриметиламмоний бромид (ЦТАБ, катионогенное, х.ч., Россия); тетрагидрофуран (ТГФ, х.ч., Россия, предварительно осушен и перегнан над Cu₂Cl₂ для удаления пероксидов), деионизированная вода. Для создания эмульсии смешивались в пропорции 1:1 (по объему) ТГФ и 0,25 М раствор NaOH, к полученной

смеси добавляли 2,5 ммоль/л ПАВ и тщательно перемешивали. Холестерин в рабочий раствор (эмульсию) добавляли в виде 0,1М раствора в ТГФ.

Методика карбоксилизации МСУНТ и модификации рабочего электрода. Навеску МСУНТ (многостенные углеродные нанотрубки, $D \cdot L = 6-13 \text{ нм} \cdot 2.5-20 \text{ мкм}$, Aldrich), 1,5 мл азотной концентрированной и 4,5 мл серной концентрированной кислот поместили в круглодонную колбу. Диспергировали с помощью ультразвукового диспергатора 2 минуты. Затем грели на при 50°C и перемешивании с обратным холодильником 6 часов. По окончании центрифугировали со скоростью 10000 об/мин в течение 5 минут, декантировали, добавляли воды, встряхивали, повторяли 3 раза. Остаток сушили ночь при комнатной температуре, затем в сушильном шкафу 2 часа при 100°C . Полученные карбоксилизированные многостенные нанотрубки (к-МСУНТ) диспергировали в воде и наносили на рабочую поверхность ТГЭ-электрода капельным методом и сушили на воздухе 20 минут при комнатной температуре.

Методика синтеза наночастиц металлов. К 20 мл воды добавляли 0,5 мл 0,01М раствора AgNO_3 и 0,1 мл 0,05 М раствора цитрата натрия (стабилизационный агент). При постоянном перемешивании добавляли 0,6 мл 0,1 М ледяного раствора борогидрида натрия. Раствор сразу же приобретал желтую характерную окраску. Золь перемешивали еще примерно 15 минут и перелили в пробирку. Методика получения красного золя золота аналогичная, вместо раствора нитрата серебра использовали раствор тетрахлораурата золота такой же концентрации.

Наночастицы типа «ядро-оболочка» получали следующим образом. К 20 мл воды добавляли необходимый объем раствора соли того металла, который будет «ядром», цитрат натрия такой же концентрации, что и соль металла. При постоянном перемешивании по каплям приливали пятикратный избыток (в мольном соотношении) борогидрида натрия, перемешивали 5 минут образовавшийся золь, затем добавляли требуемое количество раствора цитрата натрия и соли второго металла. Получившийся золь также переливали затем в пробирку.

Наносплавы готовились путем смешивания двух растворов AgNO_3 и HAuCl_4 в требуемом соотношении, затем добавляли раствор борогидрида натрия в пятикратном избытке по отношению к суммарной концентрации двух металлов. Получившийся золь также переливали затем в пробирку.

В таблице 1 отображены составы полученных наночастиц золота и серебра.

Таблица 1. Состав полученных наночастиц, мольн. %.

Металл	AuNP	AgNP	Ag@AuNP (1:1)	Au@AgNP (1:1)	Ag/AuNP (1:1)
Золото	100	0	50		50
Серебро	0	100	50		50

Далее на рабочий электрод, модифицированный ранее к-МСУНТ, наносили 5 мкл золя и высушивали на воздухе 20 минут при комнатной температуре.

Вольтамперометрические измерения проводили в эмульсии вода-NaOH-ТГФ-ПАВ после подготовки поверхности модифицированного электрода путем многократного сканирования потенциала в диапазоне от -1 до +1 В в 0,25М растворе NaOH.

2.2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор каталитической системы для электрохимического окисления холестерина

Вольтамперные характеристики модифицированных ТУЭ, зарегистрированные после формирования рабочей зоны электрода были определены для каждого типа наночастиц. Для исследования каталитической активности наночастиц использовали методы циклической вольтамперометрии и хроноамперометрии.

2.2.3.1. Наночастицы индивидуальных металлов (золота и серебра)

Согласно литературным данным [2], наночастицы золота и серебра упрощают перенос электрона через границу электрод-раствор, тем самым ускоряя электрохимическую реакцию, проходящую на их поверхности благодаря особым свойствам их поверхности, проявляющимся при нано-размерах.

На рис. 2 представлены циклические вольтамперограммы, полученные после подготовки рабочей поверхности модифицированного наночастицами AgNP и AuNP электрода путем многократного сканирования потенциала в диапазоне от -1 до +1 В в 0,25М растворе NaOH.

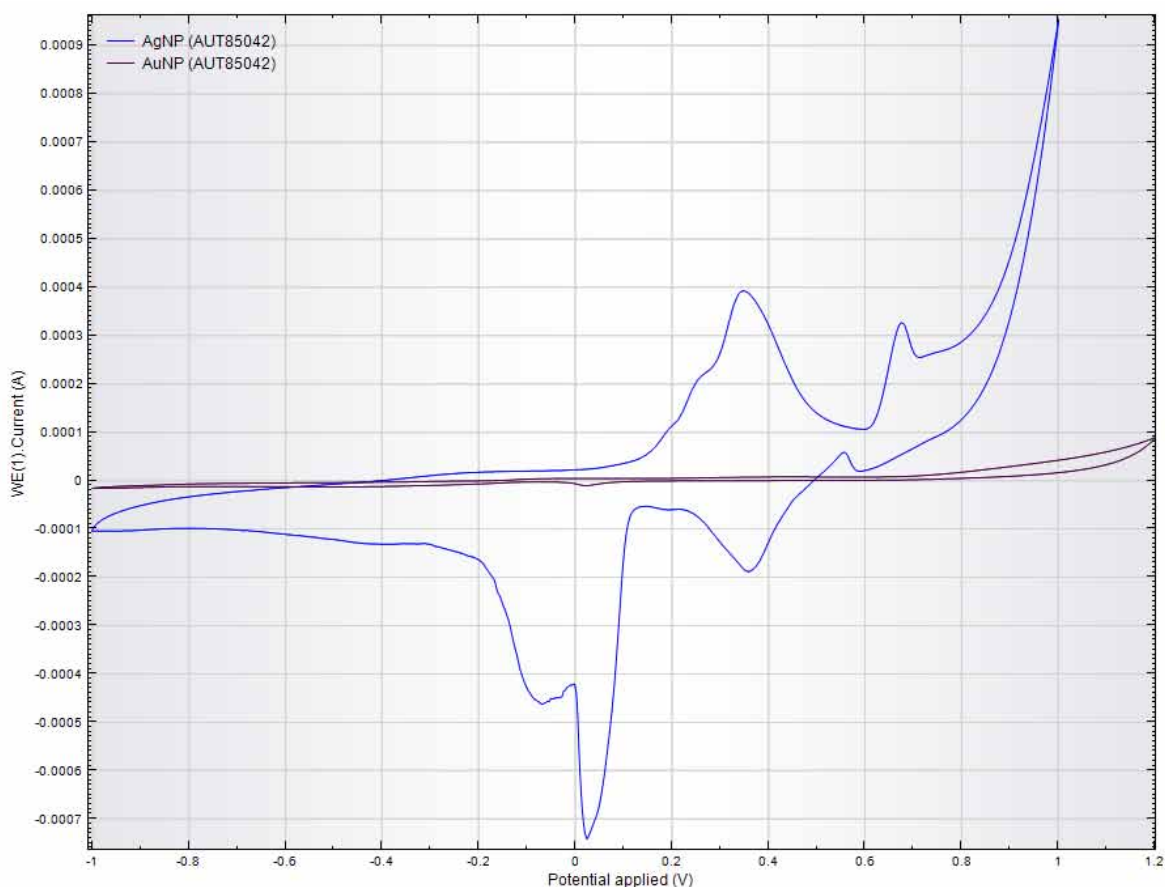
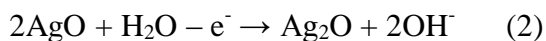


Рис. 2. Циклические вольтамперограммы, зарегистрированные за модифицированных наночастицами AgNP и AuNP ТГЭ в 0,25М растворе NaOH. Скорость сканирования 0,1 В/с.

Из рис. 1 видно, что в одних и тех же условиях пи одной и той же концентрации наиболее сильный и стабильный сигнал непосредственно он наночастиц дают AgNP. Это можно объяснить тем, что наночастицы золота растворяются при многократном сканировании.

Согласно литературным данным, пики окисления на ЦВА, зарегистрированных на AgNP-электроде, соответствуют следующим электрохимическим реакциям:



На рис. 3 представлены ЦВА, зарегистрированные в эмульсии NaOH-ТГФ-ЦТАБ с добавками холестерина. Как видно из графиков, при добавлении в раствор NaOH-ТГФ катионогенного ПАВ ЦТАБ правые анодный и катодный пики, соответствующий реакции (2) почти полностью пропадают, что говорит о значительном уменьшении скорости этой реакции в присутствии ЦТАБ. Левый анодный пик, соответствующий электрохимической реакции (1), наоборот, увеличился, что указывает на ускорение данной реакции и

облегчении переноса электрона в присутствии ЦТАБ. К сожалению, добавки холестерина не дали прироста тока окисления, а даже уменьшили его. Это может быть объяснено необратимой сорбцией холестерина на поверхности наночастиц с затруднением переноса электрона через границу наночастица-раствор. Уменьшение токов окисления при добавлении холестерина наблюдается также при использовании в качестве ПАВ ЛСН и Triton X-100.

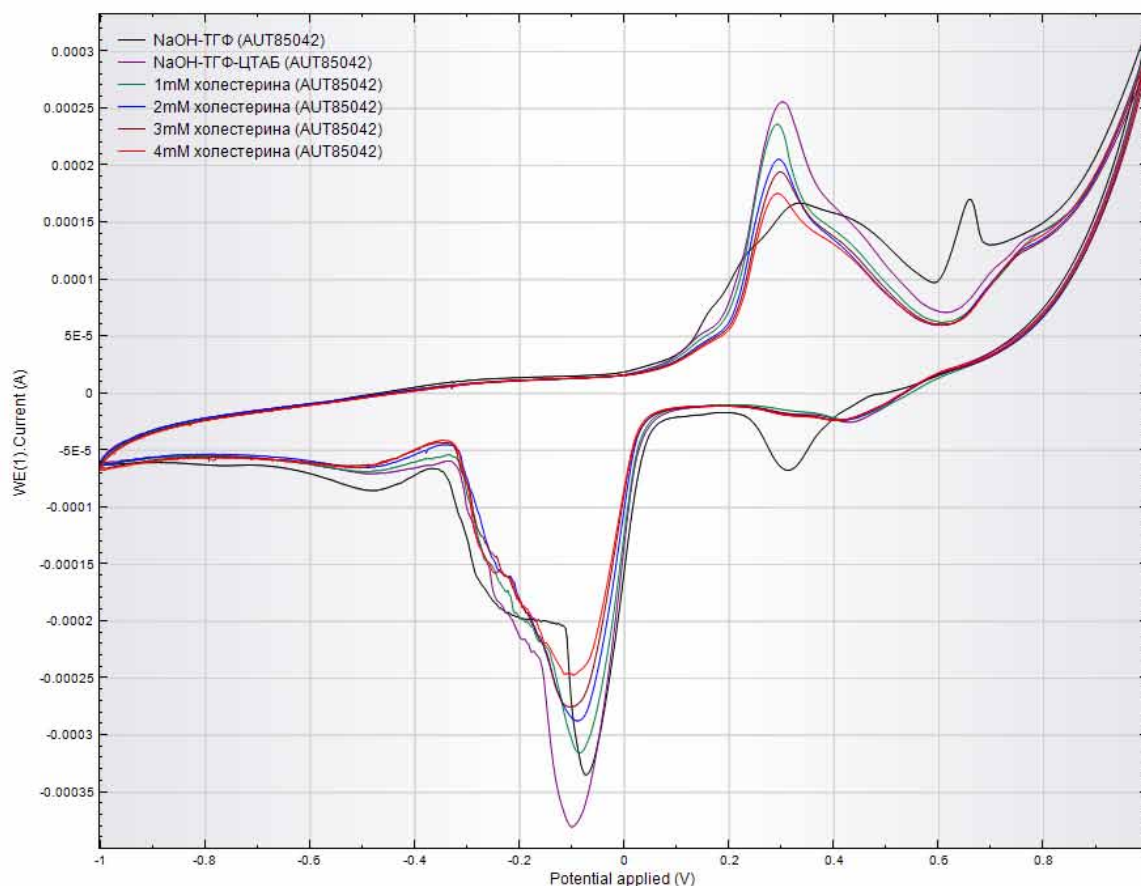


Рис.3. ЦВА, зарегистрированные на ТГЭ, модифицированном AgNP в растворе NaOH-ТГФ и в эмульсии NaOH-ТГФ-ЦТАБ с добавками холестерина. Скорость сканирования 0,1 В/с.

2.2.3.1. Наночастицы типа «ядро-оболочка».

В отличие от наночастиц индивидуальных металлов, наночастицы типа «ядро-оболочка» проявляют синергетический эффект [12], то есть усиление электрокаталитических свойств одного металла другим. В этом случае скорость электрохимической реакции может возрастать сильнее, чем при использовании наночастиц только одного металла.

На рис. 4 представлены ЦВА, зарегистрированные на модифицированном наночастицами $\text{Au@AgNP}(1:1)$ и $\text{Ag@AuNP}(1:1)$ ТГЭ-электроде в 0.25 М растворе NaOH.

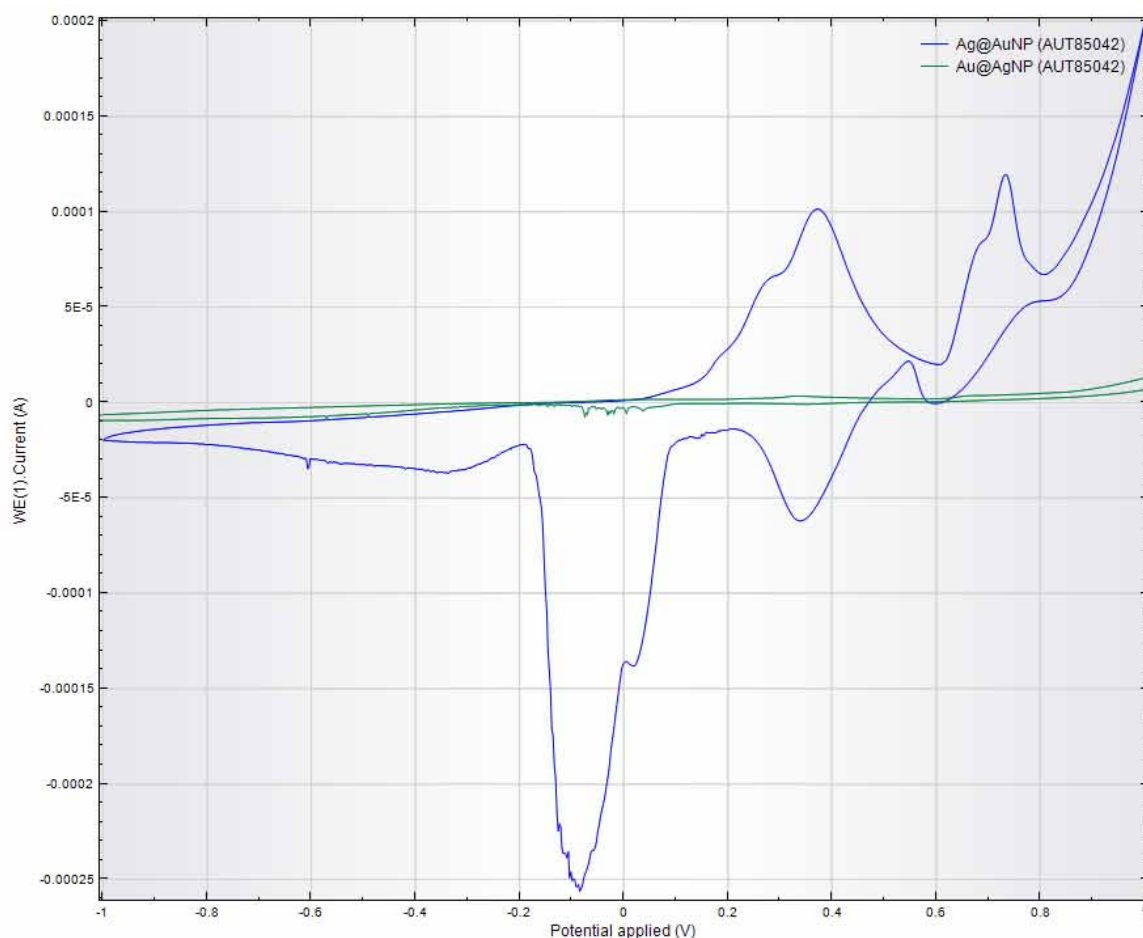


Рис. 4. ЦВА, зарегистрированные на модифицированном наночастицами $\text{Au@AgNP}(1:1)$ и $\text{Ag@AuNP}(1:1)$ -ТГЭ-электроде в 0.25 М растворе NaOH. Скорость сканирования 0,1 В/с.

Как видно из рисунка, наиболее выраженный и сильный сигнал дают наночастицы $\text{Ag@AuNP}(1:1)$. Относительно небольшой сигнал от наночастиц $\text{Au@AgNP}(1:1)$ можно объяснить так же растворением Au оболочки при многократном циклировании. Однако, по сравнению с ЦВА, зарегистрированными на AgNP -ТГЭ-электроде, на ЦВА от $\text{Ag@AuNP}(1:1)$ -ТГЭ-электроде наблюдается значительный рост правого анодного пика, соответствующий реакции (2), что может говорить о том, что золотое ядро усиливает данную реакцию.

ЦВА, зарегистрированные на $\text{Ag@AuNP}(1:1)$ -ТГЭ-электроде в растворе NaOH-ТГФ и эмульсии NaOH-ТГФ в присутствии ЛСН и холестерина, представлены на рис. 5. Как видно из ЦВА, перемещение электрода из щелочной среды в среду NaOH-ТГФ-ЛСН привело к значительному уменьшению токов обоих пиков. Добавка холестерина приводит к заметному уменьшению анодного тока. Такая ситуация может быть также объяснена

затруднением переноса электрона через межфазную границу наночастица-раствор вследствие необратимой сорбции холестерина на поверхности модифицированного электрода.

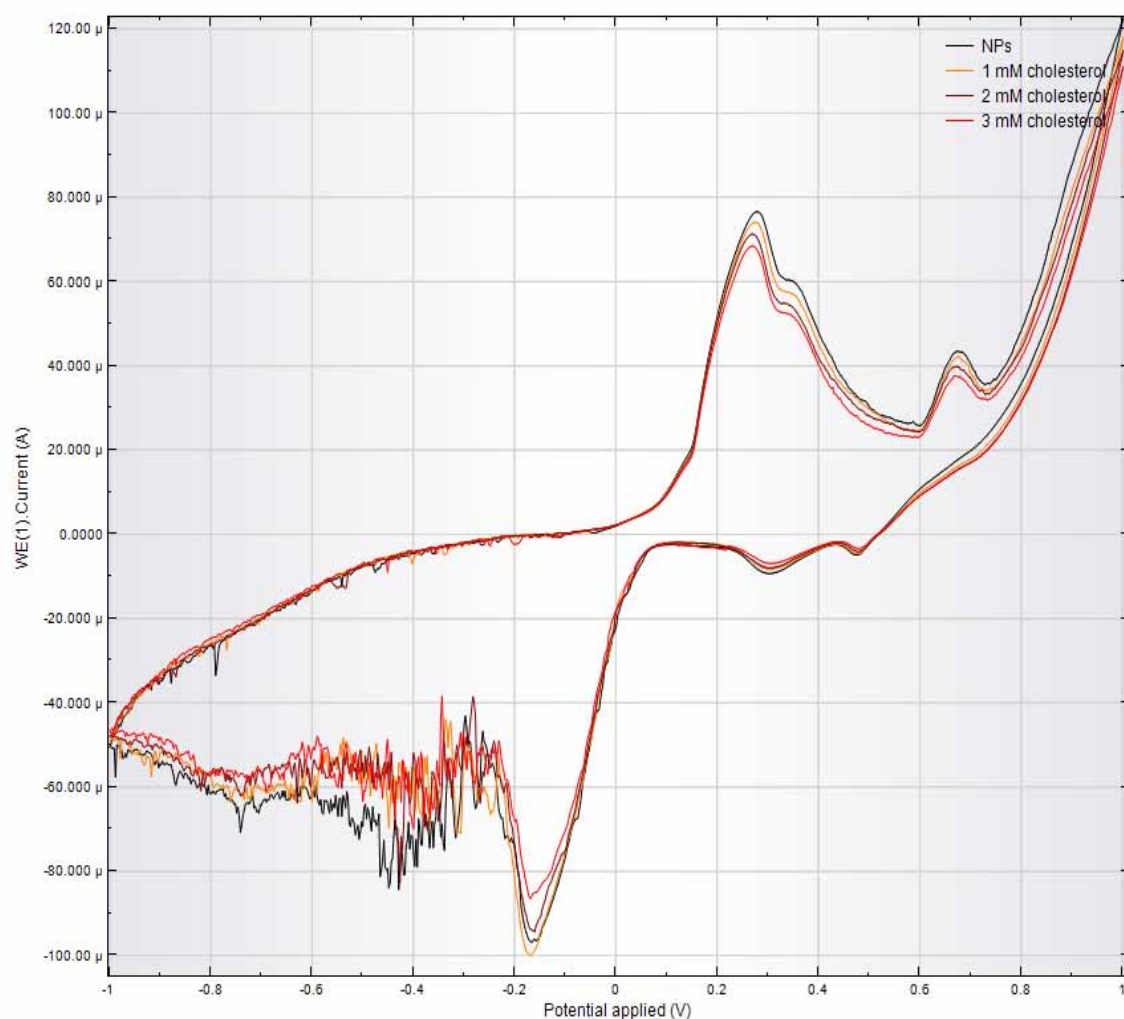


Рис. 5. ЦВА, зарегистрированные на ТГЭ-электроде, модифицированном наночастицами ядро-оболочка Ag@Au (1:1), в растворе ТГФ/0,25М NaOH (1:1), содержащем 1 мМ ЛСН при добавлении холестерина в виде раствора в ТГФ. Скорость сканирования 0.1 В/с.

Подобное поведение наблюдается на ЦВА, зарегистрированной при добавлении холестерина в систему NaOH-ТГФ-Triton X-100, представленной на рис. 6.

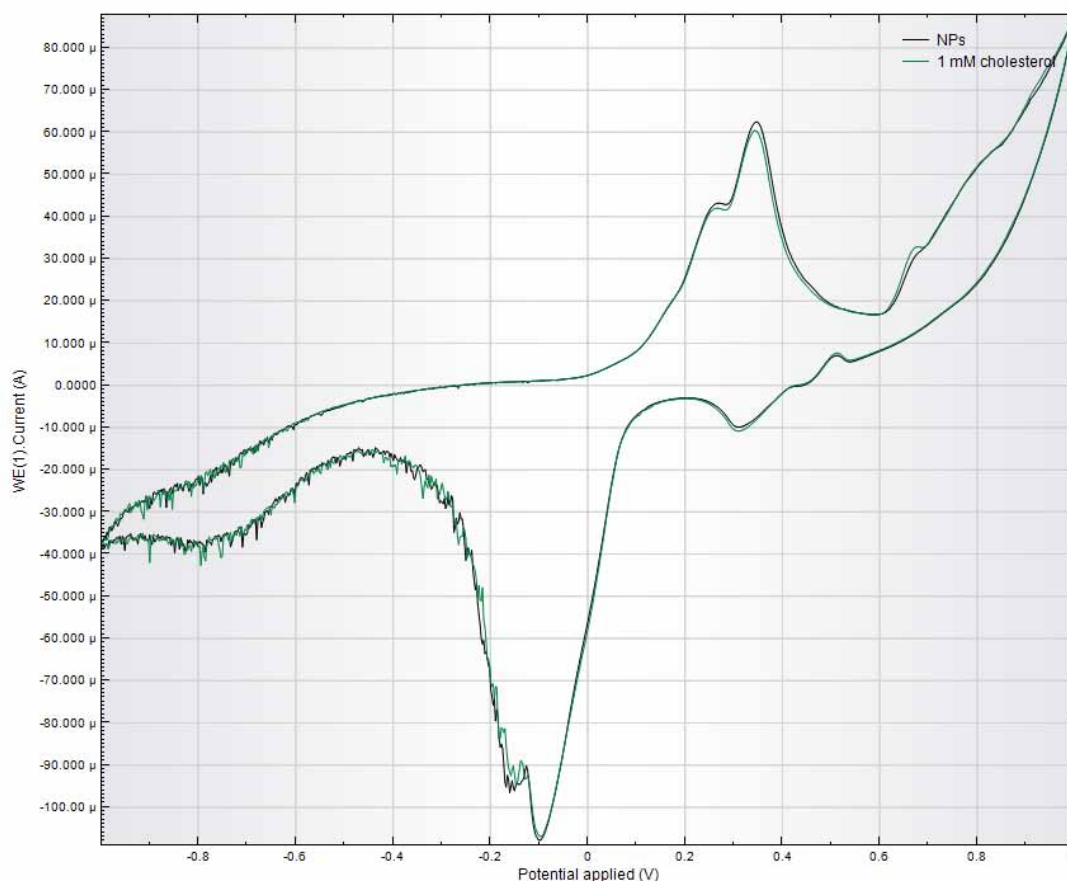


Рис.6. ЦВА, зарегистрированные на ТГЭ-электроде, модифицированном наночастицами ядро-оболочка Ag@Au (1:1), в растворе ТГФ/0,25M NaOH (1:1), содержащем 1 mM Triton X-100 при добавлении холестерина в виде раствора в ТГФ. Скорость сканирования 0.1 В/с.

При использовании в качестве ПАВ для создания эмульсии ЦТАБ наблюдается рост тока окисления при добавлении холестерина (рис. 7) с линейной зависимостью. Электрокаталитическое окисление холестерина на Ag@AuNP-ТГЭ-электроде в присутствии ЦТАБ можно объяснить тем, что он образует мономолекулярный слой на поверхности наночастиц, который облегчает подвод мицелл с холестерином к поверхности электрода и перенос электрона с холестерина на электрод.

Методом хроноамперометрии была получена линейная зависимость тока окисления холестерина от его концентрации на ТГЭ-электроде, модифицированном наночастицами ядро-оболочка Ag@Au (1:1), в растворе ТГФ/0,25M NaOH (1:1), содержащем 1 mM ЦТАБ при потенциале 0,38В и времени регистрации 60 секунд (рис. 7, врезка). Как видно из зависимости, чувствительность данного метода составляет 5,85 мкА/мМ

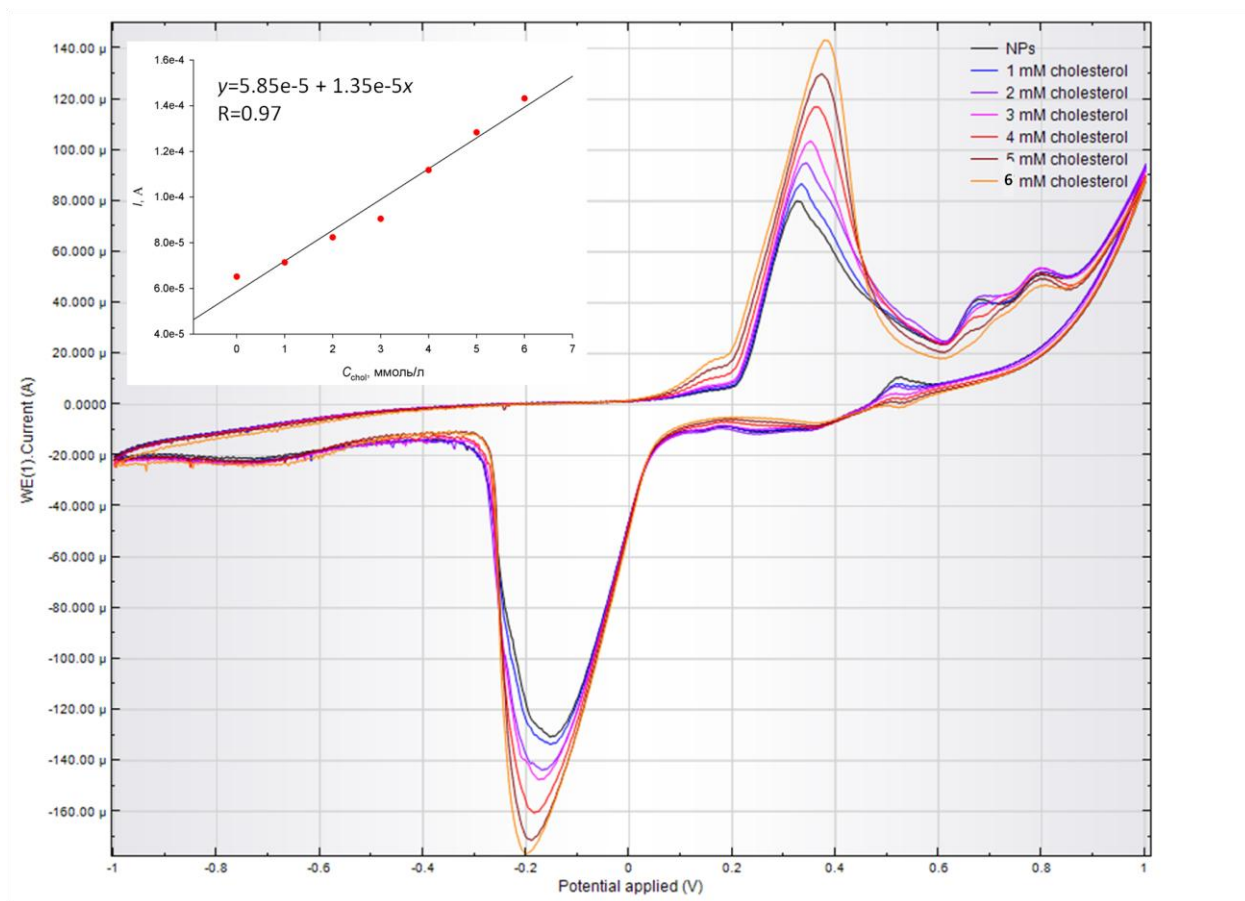


Рис.6. ЦВА, зарегистрированные на ТГЭ-электроде, модифицированном наночастицами ядро-оболочка Ag@Au (1:1), в растворе ТГФ/0,25М NaOH (1:1), содержащем 1 мМ ЦТАБ при добавлении холестерина в виде раствора в ТГФ. Скорость сканирования 0.1 В/с.

(Врезка: зависимость тока окисления аналита от его концентрации при потенциале 0,38 В, полученная методом хроноамперометрии)

2.2.3.3. Наносплав Ag/AuNP(1:1).

В отличие от наночастиц типа «ядро-оболочка» наносплавы не имеют протяженной поверхности раздела между металлами, атомы золота и серебра хаотично распределены между друг другом. Такое расположение обуславливает электрохимические свойства наночастиц Ag/AuNP. С одной стороны, при многократном циклировании на поверхности происходят реакции с участием атомов серебра (1) и (2) с образованием оксидов серебра, с другой стороны золото усиливает сигнал, растворяясь в меньшей степени, чем при циклировании AuNP и Au@AgNP. Однако, как видно из рис. 8, на котором представлена ЦВА, зарегистрированные на модифицированном наночастицами Ag/AuNP(1:1)-ТГЭ-электроде в 0.25 М растворе NaOH и в эмульсии NaOH-ТГФ-ЦТАБ, независимо от того, что сигнал от

наночастиц достаточно сильный, добавка холестерина приводит к уменьшению анодного тока окисления, по-видимому, вследствие сорбции холестерина на поверхности электрода и Ag/AuNP.

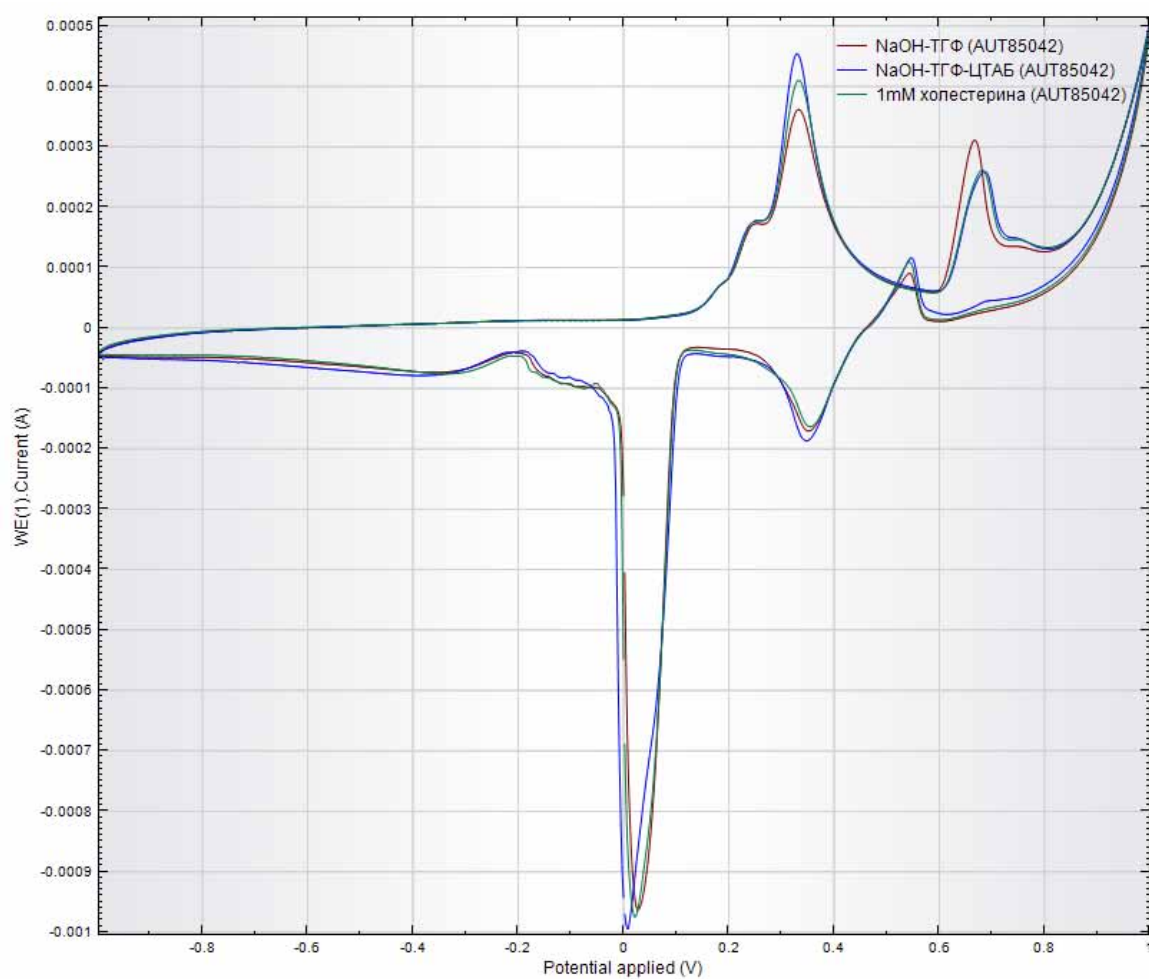


Рис. 8. ЦВА, зарегистрированные на ТГЭ-электроде, модифицированном наносплавом Ag/AuNP (1:1), в растворе ТГФ/0,25М NaOH (1:1), содержащем 1 мМ ЦТАБ при добавлении холестерина в виде раствора в ТГФ. Скорость сканирования 0.1 В/с.

Заключение

На основании выполненных исследований можно сделать следующие выводы:

1. В ходе экспериментов было установлено, что наночастицы AgNP и Ag@AuNP дают существенно более выраженный и стабильный электрохимический отклик, чем AuNP и Au@AgNP соответственно в среде NaOH и NaOH-ТГФ.
2. Было установлено, что холестерин в водно-органической эмульсии NaOH-ТГФ-ПАВ не окисляется и не дает аналитического сигнала на ТГЭ, модифицированном наночастицами AgNP, Ag@AuNP и Ag/AuNP.
3. В среде NaOH-ТГФ-ЦТАБ холестерин электрохимически окисляется на поверхности ТГЭ, модифицированном к-МСУНТ и наночастицами Ag@AuNP(1:1). Получена линейная зависимость тока окисления холестерина от его концентрации, чувствительность составила 5,85 мкА/мМ.

Список использованных источников

1. Hutchings G.J., Edwards J.K. Application of Gold Nanoparticles in Catalysis // *Front. Nanosci.* Elsevier, 2012. Vol. 3. P. 249–293.
2. Larginho M., Baptista P.V. Gold and silver nanoparticles for clinical diagnostics - From genomics to proteomics. // *J. Proteomics.* 2012. Vol. 75, № 10. P. 2811–2823.
3. Doria G. et al. Gold-silver-alloy nanoprobe for one-pot multiplex DNA detection. // *Nanotechnology.* 2010. Vol. 21, № 25. P. 255101–255101.
4. Jia L.-P., Wang H.-S. Preparation and application of a highly sensitive nonenzymatic ethanol sensor based on nickel nanoparticles/Nafion/graphene composite film // *Sensors Actuators B Chem.* 2013. Vol. 177. P. 1035–1042.
5. Kesik M. et al. A Functional Immobilization Matrix Based on a Conducting Polymer and Functionalized Gold Nanoparticles: Synthesis and Its Application as an Amperometric Glucose Biosensor // *Polymer.* 2013.
6. Narang J. et al. Silver nanoparticles/multiwalled carbon nanotube/polyaniline film for amperometric glutathione biosensor // *Int. J. Biol. Macromol.* 2012. Vol. 50, № 3. P. 672–678.
7. Paulraj P. et al. Single pot synthesis of polyaniline protected silver nanoparticles by interfacial polymerization and study its application on electrochemical oxidation of hydrazine // *Colloids Surfaces Physicochem. Eng. Asp.* 2011. Vol. 377, № 1–3. P. 28–34.
8. Gopalan A.I., Lee K.-P., Ragupathy D. Development of a stable cholesterol biosensor based on multi-walled carbon nanotubes-gold nanoparticles composite covered with a layer of chitosan-room-temperature ionic liquid network. // *Biosens. Bioelectron.* 2009. Vol. 24, № 7. P. 2211–2217.
9. Saxena U., Chakraborty M., Goswami P. Covalent immobilization of cholesterol oxidase on self-assembled gold nanoparticles for highly sensitive amperometric detection of cholesterol in real samples // *Biosens. Bioelectron.* 2011. Vol. 26, № 6. P. 3037–3043.
10. Su D.S., Perathoner S., Centi G. Nanocarbons for the Development of Advanced Catalysts // *Chem. Rev.* 2013. P. 130531080113006.
11. Wildgoose G.G. et al. Chemically Modified Carbon Nanotubes for Use in Electroanalysis // *Microchim. Acta.* 2006. Vol. 152, № 3-4. P. 187–214.
12. Douglas F. et al. Silver, gold and the corresponding core shell nanoparticles: synthesis and characterization // *J. Nanoparticle Res.* 2008. Vol. 10, № S1. P. 97–106.